

THÈSE

présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lyon

pour obtenir

le diplôme de Docteur du 3^e Cycle en Biologie Animale Appliquée

par

Simone PONCET

CARACTÉRISATION ET DOSAGE DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLÉIQUE DANS LES OVOCYTES VIERGES D'ARBACIA LIXULA (ECHINODERME)

Soutenue le 9 Octobre 1963

devant la commission d'examen :

MM. NIGON, Président

LAVIOLETTE

LEGAY

} **Examineurs**

Travaux du Laboratoire de Zoologie Expérimentale
de la Faculté des Sciences de LYON — N° 2

S i m o n e P O N C E T

CARACTERISATION ET DOSAGE DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE
DANS LES OVOCYTES VIERGES D'ARBACIA LIXULA (ECHINODERME)⁽¹⁾

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE EXPERIMENTALE

FACULTE DES SCIENCES DE LYON

Septembre 1963

(1) Ce travail a bénéficié d'une subvention du COMMISSARIAT à
l'ENERGIE ATOMIQUE (Contrat 4965/r)



A Monsieur le Professeur NIGON, qui a guidé ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur LEGAY et Monsieur le Professeur LAVIOLETTE ont bien voulu accepter d'être membres du jury. Je leur adresse mes très vifs remerciements.

Je remercie également Monsieur DAILLIE, Maître-Assistant, pour les conseils qu'il m'a donnés au cours de ce travail, ainsi que Madame SZAFRANEK, responsable de l'imprimerie du texte.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554212_0013

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

MM. LONGCHAMBON, DOUIN, MOUSSA, GAUTHIER Henri

Professeurs Honoraires

MM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, DOUIN, Henri EYRAUD.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseur

M. MESNARD

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
DEJARDIN	Physique générale
COURTY	Chimie - Physique
PRETTRE	Chimie industrielle
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie
COLONGE	Chimie organique
FLANDRIN	Géologie appliquée
JANIN	Physique expérimentale
BERNARD	Physique industrielle
DUFAY Jean	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
VIRET	Géologie générale
WAUTHIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie - Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire
DREUX	Chimie organique
TEICHNER	Chimie industrielle
PAVANS de CECCATTY	Zoologie
DUFAY Maurice	Physique de l'atmosphère

MERLIN
FRAISSE

Chimie analytique
Mathématiques

Professeurs sans chaire

MM. GAUME	Physique
PHILBERT	Physique nucléaire
COHEN-ADAD	Chimie
DEPRAZ	Physique nucléaire
FERON	Mathématiques
LAFORGUE	Physique
DAVID Louis	Géologie générale
GAUTHIER Jean	Chimie
LEGAY	Zoologie expérimentale S.P.C.N.
UZAN	Physique S.P.C.N.
CHENEVOY	Géologie appliquée
CHANEL	Psychophysiologie
ASCH	Physique
GINET	Zoologie
MAURY	Mathématiques
MICHEL	Minéralogie
DUCET	Biologie végétale.

Maîtres de Conférences

Mle MAITROT	Physique
Mme ERICSON	Physique générale
GEVIN	Géologie générale
PONASSE	Mathématiques
MARTEL	Mécanique
CHERY	Physique
LEFEBVRE	Mathématiques
d' INCAN	Physique
PERNET	Mathématiques
Mle GAUTHERON	Chimie biologique
BERGEON	Physique C.S.U.
MATHIEU	Mécanique des Fluides
LUBET	Physiologie
ERBEIA	Physique
DESCOTES	Chimie organique
PICARD	Mathématiques
LEMOIGNE	Botanique

Maître de Conférences adjoint

M. PIERRON Chimie

Secrétaire Principal Honoraire

M. ROUX

Conseiller Administratif

M. BURNET

S O M M A I R E

Pages

INTRODUCTION

A - Le dosage de l'ADN dans les oeufs vierges d'Echinodermes	1
B - La synthèse de l'ADN durant la segmentation.....	3
C - But et plan du travail	4

MATERIEL ET METHODES

A - Récolte du matériel	5
B - Extraction et purification de l'ADN	6
C - Les méthodes de dosage	10
D - Détermination du nombre des oeufs	11

RESULTATS DES ANALYSES

A - Composition en bases de l'ADN dans le sperme et les ovules	12
B - La teneur des ovocytes en ADN	14

DISCUSSION	19
------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	27
---------------------	----

I N T R O D U C T I O N

De nombreux auteurs ont cherché à déterminer la quantité d'ADN présente dans un ovule d'Echinoderme. Si les plus anciens résultats attribuent au gamète femelle un stock d'ADN très élevé, de l'ordre de 5 à 600 fois la quantité d'ADN dosée dans les spermatozoïdes des mêmes espèces, l'examen chronologique des différents résultats montre que plus les méthodes d'extraction et de dosages deviennent spécifiques, moins la quantité d'ADN dosée est élevée. Après avoir refait cet historique, nous examinerons quelques données tirées de l'étude de l'ADN durant la segmentation de l'oeuf. De l'ensemble, nous tirerons quelques conclusions qui fixeront le but du présent travail.

A - LE DOSAGE DE L'ADN DANS LES OEUFS VIERGES D'ECHINODERMES

En 1948, extrayant par la méthode qui porte leur nom, SCHMIDT et THANNHAUSER analysent les oeufs vierges d'Arbacia punctulata. Au terme de l'extraction, l'ADN est estimé grâce au dosage colorimétrique du phosphore. Ils trouvent $600 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN par oeuf, c'est-à-dire environ 600 fois plus que dans les spermatozoïdes de la même espèce.

En 1949, VENDRELY, utilisant la méthode d'extraction selon SCHNEIDER et le dosage colorimétrique du désoxyribose par la méthode de DISCHE, détermine dans les ovules de ce même échinoderme $220 \times 10^{-6} \mu\text{g}$, c'est-à-dire une quantité moindre mais très importante par rapport au stock haploïde dosé dans les spermatozoïdes. Appliquant la même technique aux oeufs vierges de Paracentrotus lividus, en 1952, il arrive à un résultat identique pour les gamètes femelles de cette espèce : $220 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN.

HOFF-JØRGENSEN (1954) utilise la méthode de dosage microbiologique qu'il a mise au point. Par cette méthode, basée sur l'exigence du Thermobacterium acidophilus R26 en desoxyribosides et desoxyribotides, il trouve 24 fois plus d'ADN dans les gamètes femelles de Paracentrotus lividus que dans les spermatozoïdes de ce même oursin.

La même méthode de dosage appliquée par ELSON et CHARGAFF (1952) à des suspensions d'oeufs d'Arbacia punctulata, après extraction selon SCHMIDT et THANNHAUSER, conduit à un rapport identique : 28 fois plus d'ADN dans le gamète femelle que dans le gamète mâle.

Utilisant l'extraction selon SCHMIDT et THANNHAUSER, MARSKAH et MARSHAK (1953, 1955) déterminent la quantité d'ADN par estimation d'une base, la thymine, après chromatographie et dilution isotopique. Une série d'analyses portant sur différentes espèces (Arbacia punctulata, Asterias forbesii, Tripneustes ventricosus) donne pour les gamètes femelles de ces espèces une quantité d'ADN de 3 à 10 fois celle trouvée dans les gamètes mâles analysés par la même méthode.

MARSHAK et MARSHAK complètent ces résultats d'analyse chimique par des observations cytologiques. Mais, ne parvenant pas à colorer le noyau de l'oeuf mûr d'oursin, ils arrivent à la conclusion que ce qui est dosé correspond, en réalité, à l'ADN des globules polaires restés autour de l'ovule et à celui de cellules étrangères entraînées dans la suspension d'oeufs. Ils sont les premiers à faire intervenir dans les calculs l'importante cause d'erreur que représentent ces dernières cellules. D'après eux, l'ovule mûr ne contiendrait plus d'ADN nucléaire. Ainsi les interprétations de MARSHAK et MARSHAK mettaient en question le rôle génétique généralement attribué à l'ADN.

En 1961, HINEGARDNER applique une méthode directe de vérification en analysant chimiquement des noyaux isolés à partir d'ovules d'Echinometra mathaei. Les noyaux sont obtenus à partir des "moitiés blanches", nucléées, fournies par centrifugation selon la méthode de HARVEY; la suspension est forcée à travers une aiguille hypodermique et les noyaux sont recueillis par centrifugation. Sur cette fraction nucléaire est pratiquée une extraction des acides nucléiques, selon SCHNEIDER, suivie d'un dosage colorimétrique du sucre selon DISCHE. On trouve ainsi : $0,99 \times 10^{-10}$ μ g d'ADN par noyau ovulaire. Le même do-

sage effectué sur le spermatozoïde donne $0,83 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN. Des dosages effectués par la méthode microbiologique de HOFF-JØRGENSEN fournissent des résultats très analogues : $0,89 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ pour le noyau ovulaire, $0,83 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ pour le spermatozoïde. Le noyau du gamète femelle contiendrait donc une quantité d'ADN qui correspond au stock haploïde.

HINEGARDNER explique la faible colorabilité du noyau ovulaire par une augmentation de volume du nucléoplasme, ce qui dilue la chromatine en un trop grand volume, pour que la réaction au Feulgen soit visible. En plaçant les noyaux, avant la coloration, dans des solutions de ClNa hypertoniques, leur volume se réduit de $700 \mu^3$ sur le noyau vivant, à $130 \mu^3$. Dans ce cas, le noyau de l'oeuf mûr est Feulgen positif. Il faut remarquer que la fixation qui, normalement, précède toute coloration au Feulgen, réduit le volume nucléaire de $700 \mu^3$ à $260 \mu^3$. Le traitement au ClNa 7% ne fait donc qu'accentuer ce phénomène.

Les résultats divers obtenus par les auteurs les ont conduits à des interprétations différentes. SCHMIDT et THANNHAUSER, VENDRELY s'expriment avec prudence, et n'excluent pas la possibilité d'une erreur d'ordre technique. ELSON et CHARGAFF, HOFF-JØRGENSEN, soulèvent l'hypothèse d'un ADN à localisation cytoplasmique. Enfin, pour MARSHAK et MARSHAK, le noyau de l'oeuf vierge ne contiendrait pas d'ADN; ils s'opposent en cela à la conclusion de HINEGARDNER d'après qui l'ADN nucléaire, au moins, se trouve en quantités équivalentes dans les gamètes des deux sexes.

B - LA SYNTHÈSE DE L'ADN DURANT LA SEGMENTATION

La plupart des auteurs qui ont dosé la quantité d'ADN dans les oeufs en cours de segmentation constatent que durant les premiers stades, ils ne peuvent déceler une synthèse mesurable. Ainsi, d'après HOFF-JØRGENSEN (1954), la quantité d'ADN resterait stable dans l'oeuf de Paracentrotus lividus jusqu'au stade à 16 blastomères durant lequel la teneur en ADN caractéristique de l'état diploïde se trouverait restituée dans chaque cellule. A partir de ce moment, une synthèse devient visible. HOFF-JØRGENSEN en tire la conclusion que l'ADN ini-

tialement présent constitue une réserve utilisée par l'oeuf au cours de ses premières divisions : la synthèse d'ADN ne commencerait que lorsque cette réserve est épuisée. AGRELL et PERSSON (1952) observent des phénomènes similaires chez Psammechinus miliaris, la synthèse d'ADN ne commencerait qu'au stade 32 blastomères; chez Echinus esculentus, elle débiterait lorsque l'embryon est pourvu de 500 cellules.

Cependant, les études autoradiographiques aboutissent à des résultats différents. Utilisant la thymidine tritiée, BUCHER et MAZIA (1960), NIGON et NONNENMACHER (1960), SIMMEL et KARNOFSKY (1961), FICQ, AIELLO et SCARANO (1963), FICQ et BRACHET (1963) constatent qu'une incorporation est visible dès la première division. L'étude des effets exercés par des concentrations diverses de thymidine sur l'intensité du marquage conduit NIGON et NONNENMACHER à penser que les lois de la synthèse de l'ADN sont les mêmes au cours de la première division d'Arbacia lixula et au cours des divisions suivantes; ils en concluent que, s'il existe une réserve cytoplasmique d'ADN au début de la segmentation, celle-ci ne peut être utilisée telle quelle et doit, pour le moins, subir une dégradation en nucléotides simples avant d'être incorporée dans l'ADN nucléaire.

C - BUT ET PLAN DU TRAVAIL

Les dosages effectués par les auteurs ont fourni, avec les années, des chiffres décroissants pour la quantité d'ADN dosée dans les oeufs vierges. Il paraît vraisemblable que ce changement doive être attribué au perfectionnement progressif des méthodes. Il reste toutefois que cette opinion repose davantage sur un examen purement logique des chiffres que sur une analyse détaillée des méthodes et des causes d'erreur qu'elles comportent. Les contradictions entre les résultats de MARSHAK et MARSHAK, de HOFF-JØRGENSEN, de HINEGARDNER, restent assez troublantes. De sorte que cette question m'a paru nécessiter un nouvel examen. J'ai tenté d'employer des méthodes d'extraction et de purification nouvelles pour ce matériel, de pratiquer les dosages au cours des étapes successives de l'analyse afin de suivre les progrès de la purification. De plus, les auteurs se sont rarement livrés à un examen quantitatif de la précision de leurs résul-

tats. Je me suis attachée à ce point et, le plus souvent possible, j'ai effectué plusieurs déterminations afin d'établir ensuite l'intervalle de confiance de la moyenne.

Dans l'hypothèse où il existerait une réserve d'ADN cytoplasmique, j'ai pensé qu'il pourrait s'agir d'un ADN anormal, analogue à celui décrit par DURAND (1955) dans les ovaires de grillon. Dans cet esprit, j'ai dosé deux bases de l'ADN, l'adénine et la thymine, de façon comparative dans l'ADN extrait des ovocytes et dans celui fourni par les spermatozoïdes.

Nous examinerons d'abord les méthodes employées, puis les résultats auxquels ces méthodes ont conduit.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

Le travail a été effectué sur Arbacia lixula, espèce européenne correspondant à Arbacia punctulata d'Amérique du Nord ⁽¹⁾.

Après la récolte du matériel, nous envisagerons les différentes techniques d'extraction et de purification de l'ADN qui précèdent l'analyse proprement dite.

A - RECOLTE DU MATERIEL

1) La ponte des femelles est recueillie dans de l'eau de mer fraîche, après un rinçage du test à l'eau douce destiné à éliminer ou à inactiver les gamètes mâles qui pourraient s'y trouver fixés. On réalise ensuite une filtration sur plusieurs couches d'étamine pour éliminer les corps étrangers (fèces, algues, etc....) ainsi

(1) Une partie importante du travail a été effectuée dans les stations de VILLEFRANCHE S/MER et de TAMARIS S/MER. Je remercie MM. P. BOUGIS et G. PERES, Directeurs de ces stations, pour les facilités qu'ils m'ont accordées.

qu'une partie au moins des conglomérats cellulaires qui viennent toujours souiller les récoltes : malgré tous les soins, nous n'avons pu éliminer la totalité des cellules étrangères.

La récolte du sperme s'effectue dans des tubes de Borel contenant un peu d'eau de mer. Après filtration, le sperme est mis en suspension dans de l'eau de mer, puis centrifugé, à 0°, à 6000 t/m, pendant 10 minutes. On élimine ainsi un surnageant jaunâtre.

2) Le dégangage des oeufs est réalisé en ajoutant à la suspension d'oeufs 10 cc. d'acide acétique N/30 par litre de liquide. Après agitation vigoureuse durant 3 à 5 minutes, la disparition de la gangue est vérifiée au microscope en présence d'encre de Chine. Cette opération permet d'éliminer les globules polaires qui se trouvent sous la gangue.

Par plusieurs décantations successives dans l'eau de mer, dans des bocaux de 2 à 3 l., on rince les oeufs en rejetant ceux qui, ayant été lésés par ces manipulations, se sédimentent lentement. Les oeufs ainsi traités peuvent donner lieu à une fécondation et à un développement normal.

B - EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon des méthodes classiques comportant un traitement par une solution de ClNa à chaud et une hydrolyse des extraits par la potasse, destinée à dégrader l'ARN. Les préparations ainsi obtenues restent encore très impures. On y a ajouté un traitement par la desoxyribonucléase qui permet de recueillir l'ADN sous forme de nucléotides acido-solubles séparés d'un culot précipitable. Ce traitement par la desoxyribonucléase peut être éventuellement précédé d'une déprotéinisation.

Nous examinerons successivement le broyage, la délipidation, l'extraction des composés acido-solubles, l'extraction des acides nucléiques et la purification de l'ADN.

1) Le broyage des spermatozoïdes comme celui des ovules est réalisé dans l'alcool 95°, à l'aide d'un broyeur à couteaux concentriques (Ultra-turrax). L'ensemble est maintenu dans un bac de

glace. Dans ces conditions, le sperme fournit rapidement une suspension homogène. Les oeufs, au contraire, durcis par l'alcool, exigent un broyage assez long qui est réalisé en plusieurs fois pour éviter un échauffement trop important (température maximum atteinte : 22°C).

2) La délipidation. L'oeuf d'Arbacia contient peu de lipides de réserve, mais l'échinochrome est éliminé en grande partie au cours de cette manipulation, ce qui la rend particulièrement utile.

On amène à ébullition les culots d'oeufs ou de spermatozoïdes maintenus en suspension, par agitation magnétique, dans différents solvants :

- alcool 75° (15 minutes)
- alcool 90° (15 minutes)
- alcool 100° (15 minutes)
- alcool 100°-éther 1:1 (30 minutes)
- éther sulfurique (30 minutes)

Chaque fois, les surnageants chargés de pigments sont éliminés après centrifugation.

A la fin de la délipidation, le culot résiduel est laissé à l'air libre pendant une dizaine d'heures pour permettre l'évaporation totale de l'éther.

On évalue alors le poids sec délipidé qui fournira un chiffre de référence permettant de comparer deux extractions.

3) L'extraction des composés acido-solubles est réalisée en deux fois par l'acide trichloracétique 10%, agissant à -2°, pendant 20 minutes. Elle est suivie de rinçages (eau distillée, alcool 100°, éther sulfurique) qui ont pour but d'éliminer l'acide trichloracétique, afin de ramener le pH de la suspension à une valeur voisine de 6.

4) Extraction des acides nucléiques : les acides nucléiques accompagnés de protéines sont extraits à pH = 7,5 (le pH est ajusté par addition de $\text{NaOH} \frac{N}{10}$) à plusieurs reprises par une solution de chlorure de sodium à 10%, au bain-marie bouillant avec agitation continue. Le temps d'extraction et le volume de solution saline employé varient avec l'importance du culot traité.

Dans le cas des oeufs, la première extraction est

marquée par la formation d'une mousse abondante. Après centrifugation (6000 t/m) on obtient un surnageant teinté par l'échinochrome.

La totalité des nucléoprotéines d'un culot d'oeufs important, (20 gr de poids sec délipidé) est extraite en 3 heures. Une extraction supplémentaire donne un surnageant qui ne précipite plus par acidification. Pour un tel culot, le volume final du surnageant est de 4 à 500 cc.

Pour le sperme, la quantité d'ADN est telle que la solution d'extraction doit être renouvelée toutes les 10 minutes.

L'acidification des surnageants, par HCl N, à pH = 1, provoque la précipitation "d'un acido-insoluble" qui comporte à côté des acides nucléiques une quantité importante de contaminants protéiques.

5) Elimination de la majeure partie de l'ARN. Une hydrolyse alcaline est effectuée dans le but d'éliminer l'ARN et une partie des contaminants protéiques. Le précipité obtenu est dissous dans une solution de potasse 0,3 N, maintenue pendant 17 heures dans un bain-marie à 37°. La dissolution s'effectue lentement et nécessite un volume de potasse de 100 à 200 cc, dans le cas où la matière initiale traitée a un poids sec délipidé voisin de 20 gr. Au cours de l'hydrolyse, la solution souvent très colorée au départ, devient jaune ambré. Cette hydrolyse, n'affectant que faiblement l'ADN, dépolymérise l'ARN en mononucléotides acido-solubles.

Après neutralisation de la suspension par l'acide perchlorique à 10% qui précipite la potasse, une acidification par HCl N précipite l'ADN tandis que l'ARN reste dans le surnageant. Le culot, obtenu par centrifugation, est lavé à plusieurs reprises par une solution acide. Ce culot, contenant l'ADN, est dissous suivant son importance dans 10 à 20 cc d'une solution de bicarbonate de sodium à 2°/oo.

Les dosages colorimétriques de DISCHE et de MEJBAUM effectués sur cette solution révèlent qu'il subsiste encore autant d'ARN que d'ADN alors qu'au départ, le rapport ARN/ADN est de l'ordre de 300 dans les oeufs.

6) Déprotéinisation. A l'extrait ADN dissous dans une

solution de C1Na 10%, on ajoute en volume $1/3$ d'un mélange alcool amylique-chloroforme (35 : 10). L'agitation de ce mélange provoque la formation d'une émulsion qui, centrifugée à -2° pendant 1 heure à la vitesse de 7000 t/m fournit trois couches :

- La couche supérieure est formée du mélange chloroforme-alcool amylique.
- La couche moyenne est une gelée blanchâtre constituée de protéines.
- La couche inférieure, relativement claire, contient l'ADN.

La couche inférieure est prélevée, le même traitement est répété à 8 reprises. A la fin, l'ADN est précipité en amenant la solution à pH 1 par HCl N/10.

Au cours de cette opération, les pertes en ADN sont importantes, représentant 25 à 30% de l'ADN initial, mais le culot d'ADN redissous dans le bicarbonate de sodium à $2^\circ/\text{oo}$ ne présente plus de réaction positive au test de MEJBAUM : l'ARN contaminant a donc pratiquement disparu.

7) Digestion enzymatique de l'ADN. Par l'emploi de la desoxyribonucléase (WORTHINGTON BIOCH.) l'ADN subit une dépolymérisation en nucléotides acido-solubles. Cette digestion s'effectue à 37° en présence de sulfate de magnésium. A environ 4 mg d'ADN dissous dans 5 cc de bicarbonate de sodium à $2^\circ/\text{oo}$, on ajoute 1 cc d'une solution de SO_4Mg ($4 \times 10^{-2}\text{M}$) et 1 mg de desoxyribonucléase dissous dans 1 cc d'eau distillée. Ce mélange est maintenu pendant 24 heures, à 37° , à pH = 7,2 (tampon bicarbonate); les développements bactériens sont inhibés par une pellicule de toluène.

Par centrifugation, après acidification à pH = 1 par HCl N/10, on recueille un culot de protéines résiduelles et un surnageant chargé de nucléotides de l'ADN. Un dosage de BURTON effectué sur ce dernier montre que 95 à 97% de l'ADN présent avant l'emploi de la desoxyribonucléase a été retrouvé sous forme de nucléotides solubles.

En définitive, on opère donc une extraction quantitative de l'ADN par des solutions salines, une partie des impuretés étant éliminée par précipitation acide après hydrolyse alcaline. Les extraits ainsi obtenus restent relativement souillés de protéines et

d'ARN. Une purification complète peut être effectuée par une déprotéinisation qui entraîne toutefois des pertes importantes; on obtient ainsi un ADN qui peut être soumis à l'analyse, mais le rendement faible de l'opération interdit de s'en servir pour estimer la quantité d'ADN présente. Une autre méthode consiste à traiter l'extrait impur, par la DNase, les constituants de l'ADN se trouvant désormais sous forme soluble dans le surnageant : cette opération s'effectue avec un rendement de l'ordre de 95%. Dans certains cas, on peut combiner une déprotéinisation suivie d'une action de la DNase : on obtient de cette façon une élimination particulièrement sûre des contaminants, mais on souffre du faible rendement qui résulte de la déprotéinisation.

Ces diverses méthodes seront employées au gré des besoins, selon les objectifs fixés au cours des diverses phases de l'analyse.

C - LES METHODES DE DOSAGE

On a employé des méthodes d'analyse classiques. Le dosage du désoxyribose a été effectué par la méthode de BURTON (1956) et, par ce moyen, les extraits ont été comparés à un ADN témoin extrait de la laitance de poisson.

Le dosage des bases a été effectué après hydrolyse formique poursuivie durant une heure à 175°, en tube scellé. Les bases sont ensuite purifiées sur papier par électrophorèse (DAILLIE et NEULAT, 1961) suivie d'une première chromatographie en présence d'Isopropanol HCl 5,5 N, puis d'une seconde chromatographie par le mélange Butanol-Ammoniaque N/10. Dans l'électrophorèse, le tampon phosphate employé par DAILLIE et NEULAT a été remplacé par du bicarbonate de sodium à 2°/00 qui permet un dépôt plus facile des éluats, sans former de croûtes comme le fait le tampon phosphate. La première chromatographie permet une bonne purification de l'adénine tandis que la seconde est nécessaire pour purifier convenablement la thymine. L'addition préalable d'adénine et de thymine ¹⁴C permet de vérifier le rendement de l'opération et d'apporter une correction par la méthode classique de dilution isotopique. Les bases purifiées sont dosées par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

D - DETERMINATION DU NOMBRE D'OEUFS

Les méthodes précédentes fournissent des chiffres de quantités d' ADN rapportées à un certain poids d'oeufs : ces derniers sont pesés à l'état sec après délipidation. Afin de rapporter les chiffres trouvés au nombre des oeufs, il était donc nécessaire de déterminer la quantité moyenne d'oeufs par gramme de poids sec délipidé. Cette opération a été réalisée de la façon suivante.

A partir d'une suspension d' oeufs dans l' eau de mer, dont l'homogénéité est maintenue par agitation continue, on prélève un aliquot A d'environ 30 cc et un autre a d'environ 1 cc. Chacune de ces prises est pesée. La prise de 30 cc est soumise au traitement habituel de délipidation. La prise de 1 cc est diluée dans 100 cc d'eau de mer exactement mesurés et sert au comptage proprement dit. Ce dernier est effectué à l'aide d' un compteur électronique Coulter. Cette opération a été répétée 9 fois afin de fournir une moyenne. Voici un exemple de calcul :

- Poids de l' aliquot A	=	40,35	gr
- Poids sec délipidé de A	=	1,42	gr
- Poids de l'aliquot a	=	0,836	gr

La suspension de a additionnée de 100 cc d'eau de mer donne, au compteur, en moyenne 5908 ± 200 oeufs par cc. Soit dans la suspension initiale :

$$\frac{5908 \times 100,836}{0,836} = 712.606 \text{ oeufs / gramme}$$

Ce qui donne par gramme de poids sec délipidé :

$$\frac{712606 \times 40,35}{1,42} = 20.249.050 \text{ oeufs}$$

L'ensemble des opérations effectuées fournit le chiffre moyen de $(204 \pm 1,5) 10^5$ oeufs par gramme de poids sec délipidé, le dernier chiffre étant l'intervalle de confiance de la moyenne.

R E S U L T A T S D E S A N A L Y S E S

Les méthodes précédentes ont été employées dans deux buts:

- A - On a cherché à définir, au moins en partie, l'ADN extrait des ovocytes par comparaison à celui des spermatozoïdes. Rappelons, en effet, que DURAND (1955) a constaté chez le grillon l'existence, dans l'ovaire, d'un ADN de composition anormale, comportant un excès de thymine par rapport à l'ADN du testicule. Il est évident que, dans une telle éventualité, une comparaison quantitative fondée sur le dosage de la thymine, entre l'ADN de l'ovule et celui du sperme, aurait été illusoire.
- B - On a cherché à déterminer la quantité d'ADN présente dans un ovocyte.

Les résultats de ces deux ordres de recherches seront examinés successivement.

A - LA COMPOSITION EN BASES DE L'ADN DANS LE SPERME ET DANS LES OVULES

Des études antérieures (MARSHAK et VOGEL, 1951; CHARGAFF et al, 1952) ont fourni des données précises sur la composition de l'ADN de sperme, chez divers échinides. On s'est donc borné à l'étude du rapport Adénine/Thymine. J'ai cherché à obtenir des échantillons de base débarrassés au maximum de contaminants protéiques et ARN. L'extrait de sperme a donc été traité par la DNase.

Les résultats obtenus après hydrolyse avec dilution isotopique et dosage pour quatre lots de sperme sont portés dans le tableau suivant :

n°	ADENINE (1)	THYMINE (1)	ADENINE (2)	THYMINE (2)	A/T
ESSAI 1	57,7	38,5	1,21	1,25	0,96
ESSAI 2	51,7	43,2	1,16	1,20	0,97
ESSAI 3	113,8	231,2	5,57	5,55	1,00
ESSAI 4	226,4	244,3	5,73	5,85	0,97

(1) - Quantité recueillie sur le chromatogramme (en μg).

(2) - Quantité dans l'hydrolysât, avec correction de la dilution isotopique, en μmole .

Afin de vérifier que l'ADN n'était pas contaminé par de l'ARN, nous avons incorporé avec les autres bases de l'uracile marqué au ^{14}C . L'uracile retrouvé sur les chromatogrammes avait une activité spécifique finale sensiblement égale à son activité spécifique initiale. Il n'avait donc pas subi de dilution.

Pour l'ADN des ovules, des dosages réalisés sur des extraits obtenus sans déprotéinisation suffisante ont montré un excès d'adénine avec des rapports A/T compris entre 2,3 et 2,8. Après déprotéinisation et action de la desoxyribonucléase, ce rapport est sensiblement équivalent à celui qui caractérise l'ADN du sperme. En effet, les éluats recueillis contiennent 19,59 μg d'adénine et 20,81 μg

de thymine; la méthode de dilution isotopique permet de déterminer les quantités de base initialement présentes dans l'hydrolysate, c'est-à-dire 133,5 μ g d'adénine et 126,3 μ g de thymine. La valeur du rapport A/T établi en μ moles est alors 0,98. Là aussi, l'addition d'uracile ^{14}C a permis de constater, dans ce dernier lot, l'absence de contamination par l'ARN.

L'ensemble de ces résultats conduit à constater .

- a) que la contamination par l'ARN disparaît seulement après une déprotéinisation très poussée. On peut supposer que les nucléotides de l'ARN restent fixés sur les protéines.
- b) que les chiffres obtenus, identiques pour le sperme et les ovules, permettent d'estimer que la composition de l'ADN est semblable dans les deux cas.

B - LA TENEUR DES OVOCYTES EN ADN

Nous avons évalué la teneur des ovocytes en ADN par le dosage colorimétrique du sucre et par le dosage de la thymine.

Les dosages de sucre ont été effectués sur l'extrait obtenu après extraction saline, avant que l'on ne procède à la déprotéinisation et au traitement par la DNase. La thymine, au contraire, a été obtenue à partir d'extraits traités par la DNase.

Nous examinerons successivement les résultats des deux sortes de méthodes. Nous verrons ensuite quelques éléments correctifs qui doivent être introduits dans ces évaluations.

1° - Dosages proprement dits

- a) Dosage par le sucre.

Dix extractions salines ont porté sur des culots dont le poids sec délipidé varie de 1 à 25 gr.

A la fin de l'extraction saline, une partie de l'ADN dissous dans du bicarbonate de sodium à 2°/100 est hydrolysée par APC 5%. A partir de cet hydrolysate, on prépare 2 tubes pour 2 concentrations différentes d'ADN, à déterminer. Les valeurs retenues sont celles qui correspondent à des concentrations situées au milieu de

l' échelle de validité du dosage selon BURTON, c'est-à-dire de 5 à 35 μg de désoxyribose par cc. Pour un même extrait, la précision des mesures est de l'ordre de 1/100.

L'ensemble des résultats ramenés au poids sec délipidé (mg d'ADN/gr. de P.S.D.) a fourni le chiffre moyen de $0,11 \pm 0,01$ ($\pm 0,01$ représente l'intervalle de confiance de la moyenne soit $\frac{2s}{\sqrt{N}}$).

Si l'on tient compte de la teneur moyenne précédemment établie, c'est-à-dire $(204 \pm 1,5)10^5$ oeufs/gr. de poids sec délipidé et de la précision des diverses mesures, on trouve finalement :

$$(5,6 \pm 0,5)10^{-6} \mu\text{g d'ADN par oeuf vierge.}$$

b) Dosage par la thymine.

La purification et le dosage de la thymine ont été effectués sur les surnageants obtenus après traitement par la DNase. La dilution isotopique a permis de déterminer la quantité de thymine initialement présente dans l' extrait ADN hydrolysé avec une précision dont on peut calculer qu'elle doit être supérieure à $\pm 6\%$:

Calcul d'erreur de la dilution isotopique :

Soit ASI et ASF les activités spécifiques initiale et finale, x la quantité de thymine traceuse ajoutée, y la quantité de thymine cherchée, on sait que :

$$y = \left(\frac{ASI}{ASF} - 1 \right) x$$

D'où on calcule facilement l'erreur relative sur y

$$\frac{\Delta y}{y} \leq \left[\left(\frac{x}{y} + 1 \right) \left(\frac{\Delta ASI}{ASI} + \frac{\Delta ASF}{ASF} \right) \right] + \frac{\Delta x}{x}$$

Si l'on admet sur ASI, ASF et x une erreur relative maximum de 2% :

$$\frac{\Delta y}{y} \leq \left[\frac{4}{100} \left(\frac{x}{y} + 1 \right) \right] + \frac{2}{100}$$

et comme x est petit devant y ($x = 9,0 \mu\text{g}$ et $y = 186,8 \mu\text{g}$)

$$\frac{\Delta y}{y} \leq 6\%$$

La quantité de thymine recueillie sur le chromatogramme est de $18,6 \mu\text{g}$. Le calcul de la dilution isotopique permet de déterminer la quantité de thymine initialement présente dans tout l'hydrolysat, soit : $186,8 \mu\text{g}$.

On obtient finalement la valeur de : $(5,1 \pm 0,3)10^{-7} \mu\text{g}$ de thymine par oeuf. Si on adopte pour le rapport thymine/ADN la valeur

0,103 établie par MARSHAK et VOGEL (1951) dans l'ADN du sperme d'Arbacia, on obtient alors la valeur moyenne de $(4,9 \pm 0,3)10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN par oeuf.

Il ressort de l'examen de ces résultats que

α) les estimations de l'ADN par le sucre et par la thymine conduisent à des valeurs très voisines.

β) que ces quantités sont encore très élevées par rapport aux valeurs trouvées par les auteurs dans les gamètes mâles

- $1 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN pour Arbacia punctulata - ELSON et CHARGAFF (1952)
- $0,79 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN pour Arbacia punctulata - MARSHAK et MARSHAK (1953)
- $0,71 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN pour Paracentrotus lividus - HOFF - JØRGENSEN (1954)
- $1,17 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN pour Tripneustes ventricosus - MARSHAK et MARSHAK (1955)
- $0,83 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN pour Echinometra mathaei - HINEGARDNER (1961)

2° - Détermination de l'importance des cellules étrangères

A partir de la suspension d'oeufs destinés à l'extraction, on réalise une dizaine de frottis qui sont fixés dans l'alcool. Les frottis sont ensuite colorés par la méthode de Feulgen. L'examen des préparations montre que malgré de nombreuses filtrations, les ovocytes sont contaminés par des amas, très denses parfois, de cellules étrangères. Ces cellules proviennent sans doute de l'ovaire et sont rejetées par l'animal en même temps que les oeufs. Par contre, on ne trouve pas de globules polaires qui sont sans doute éliminés au cours du dégangage.

J'ai essayé de déterminer le nombre de ces cellules par rapport au nombre d'oeufs. Pour ce dénombrement, on opère de la manière suivante : on compte les ovocytes dans le champ du microscope en déplaçant la préparation longitudinalement et transversalement, tout en évaluant le nombre de cellules contaminantes. A l'intérieur d'un amas, il s'avère difficile de déterminer exactement le nombre de noyaux. On obtient donc, par ce moyen, des chiffres approximatifs résultant eux-mêmes d'un échantillonnage.

Les comptages effectués sont résumés dans le tableau suivant:

Nombre d'ovocytes	Nombre de cellules étrangères	Nombre moyen de cellules contaminantes pour un ovocyte	$\frac{x}{2-x}$	
10	50	5,0	1,0	
20	100	5,0	1,0	
30	150	5,0	1,0	
40	200	5,0	1,0	
50	250	5,0	1,0	
60	300	5,0	1,0	
70	350	5,0	1,0	
80	400	5,0	1,0	
90	450	5,0	1,0	
100	500	5,0	1,0	
		5,0	1,0	Valeur moyenne m
		5,0	1,0	$n = \frac{26}{\sqrt{N}}$

La correction à apporter sur l'ADN dosé peut être calculée par deux méthodes différentes basées sur deux types d'hypothèses à envisager :

- Soit x la proportion des ovocytes par rapport au nombre total de cellules. Si on émet l'hypothèse que les cellules contaminantes contiendraient deux fois plus d'ADN qu'un ovocyte, on arrive à la conclusion que l'ADN ovocytaire pourrait ne représenter qu'une fraction de l'ADN total correspondant à :

$$\frac{x}{x + 2(1-x)}$$

$$\frac{x}{2-x}$$

Ce rapport a une valeur moyenne de $(43 \pm 9) \%$, le dernier chiffre étant l'intervalle de confiance. Ce coefficient appliqué aux chiffres précédemment trouvés donne les résultats suivants :

$2,3 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN par oeuf. Dosage type Burton.

$2,0 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN par oeuf. Dosage de la thymine

On peut estimer que ces chiffres doivent être affectés d'une imprécision relative se montant à $\pm 25\%$, compte-tenu de l'ensemble des erreurs d'échantillonnage

Une autre méthode consiste à admettre que chaque cellule contaminante contient une quantité d'ADN équivalente à deux fois la quantité d'ADN des spermatozoïdes, soit $1,7 \times 10^{-6} \mu\text{g}$, si l'on prend le chiffre de HINEGARDNER (1961).

Comme on trouve en moyenne $0,7 \pm 0,2$ cellules contaminantes pour un ovocyte, il faudrait donc déduire pour chaque ovocyte :

$(1,2 \pm 0,3) 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN. Il resterait donc pour chaque ovocyte :

$(4,4 \pm 0,8) 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN (dosage Burton)

$(3,7 \pm 0,6) 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN (dosage par la thymine).

Nous obtenons donc, en définitive, un certain nombre d'estimations qui permettraient de penser que la quantité d'ADN par ovocyte doit être comprise entre $1,5$ et $5,2 \times 10^{-6} \mu\text{g}$.

DISCUSSION

Nous envisagerons d'abord les résultats relatifs au rapport des bases dans l'ADN des gamètes d'Arbacia; nous verrons ensuite les déterminations de la quantité d'ADN par ovocyte.

A - ANALYSE DE LA COMPOSITION EN BASE : VALEUR DU RAPPORT A/T

1° - ADN des gamètes mâles

De nombreux auteurs ont déterminé la composition en base de l'ADN du sperme dans différentes espèces d'échinodermes.

Ainsi, MARSHAK et VOGEL (1951) attribuent à Arbacia punctulata et Asterias forbesii, un rapport A/T égal à 0,99 pour le premier échinoderme et 1,09 pour le second. CHARGAFF et al. (1952) trouvent chez Psammechinus miliaris, Paracentrotus lividus, Echinocardium cordatum, Arbacia lixula, un rapport A/T de 1,02.

La méthode d'extraction que j'ai employée fournit, pour le sperme, un ADN peu contaminé, ne nécessitant pas de purifications importantes pour l'étude des bases. Les extraits ADN ont néanmoins subi différents traitements : emploi de la DNase, électrophorèse. En effet, ces traitements sont indispensables dans le cas des oeufs vierges; il fallait donc vérifier qu'ils n'introduisent pas d'erreur dans les proportions. La dilution isotopique permet, d'ailleurs, de corriger les pertes de substances qui se produisent au cours des purifications. Les résultats ainsi obtenus s'accordent avec ceux des auteurs, cette concordance paraissant suffisante pour valider les méthodes que j'ai employées. Nous trouvons, en effet, chez Arbacia lixula, une valeur de $\frac{A}{T} = 0,97 \pm 0,02$ (ce dernier chiffre représentant l'intervalle de confiance).

2° - ADN des gamètes femelles

Si la composition en bases de l'ADN du sperme a été bien définie par de nombreux auteurs, on ne trouve aucune analyse de bases relative à l'ADN de l'oeuf.

L'établissement du rapport A/T se heurte dans ce cas à de nombreuses difficultés. D'abord, la concentration d'ADN est très faible : j'ai obtenu ainsi 0,1 ‰ d'ADN par rapport au poids sec délipidé des oeufs. Ce composé, présent à l'état de traces, doit être séparé d'un ensemble complexe de protéines et de matières de réserves. Le contaminant le plus gênant est l'ARN qu'on ne peut séparer complètement de l'ADN avant d'avoir éliminé les protéines. Des dosages colorimétriques de l'ARN par la méthode de MEJBAUM montrent qu'il existe, dans l'oeuf vierge, 300 fois plus d'ARN que d'ADN. On saisit toute l'importance des purifications à effectuer avant de procéder à l'analyse des bases proprement dite.

Les premières analyses que nous avons effectuées ont été faussées par la présence de contaminant ARN, de sorte que le rapport A/T avait une valeur très élevée, comprise entre 2 et 3, ce qui aurait pu laisser supposer une déficience en thymine de l'ADN ovocytaire. Finalement, le rapport a été établi sur des bases obtenues après purifications poussées de l'ADN; les quantités recueillies sur les chromatogrammes sont de l'ordre de 20 μ g, ce qui permet un dosage avec une précision de l'ordre de $\pm$ 6%. Il est apparu ainsi que, si l'on débarrasse l'ADN de l'oeuf vierge des contaminants, il présente un rapport molaire A/T de 0,98. Les purifications génératrices de pertes importantes et le souci d'éviter les erreurs dues aux trop faibles quantités de thymine souvent dosées par les auteurs nous ont amené à concentrer la totalité de l'ADN purifié sur le même chromatogramme. Nous ne disposons donc que d'un seul chiffre, ce qui nous interdit de calculer un intervalle de confiance. Tel qu'il est toutefois, ce résultat suffit pour affirmer qu'il n'existe pas de différence significative, de ce point de vue, entre l'ADN du sperme et celui des ovocytes.

B - DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ADN PAR OVOCYTE

Nous examinerons d'abord nos propres résultats, nous verrons ensuite les commentaires que soulèvent les chiffres des auteurs à la lumière de notre expérience.

1° - Validité de nos résultats :

Les déterminations ont été faites par dosage de la thymine et par dosage du sucre de l'ADN. L'étude préalable de la composition en base ayant montré que l'ADN ovocytaire contient un taux normal de thymine, ces deux séries de résultats doivent être comparables, ce qui est effectivement observé. Il faut noter toutefois que ces chiffres sont affectés de quelques incertitudes.

a) Nous ignorons tout du rendement de l'extraction qui comporte à coup sûr des pertes. Nous observons seulement que les chiffres obtenus sont reproductibles à 10% près.

b) Le dosage du sucre n'est pas d'une spécificité au-dessus de toute critique puisqu'il porte sur un extrait traité seulement par hydrolyse alcaline. Le dosage par la thymine est certainement plus spécifique, mais il porte sur des extraits dont la purification a été plus poussée. Il se peut alors que les chiffres légèrement plus faibles obtenus dans le dosage par la thymine doivent être attribués, pour une partie, à une perte en cours de purification. On note enfin que le taux de thymine trouvé a été transformé en ADN par l'utilisation de la teneur en thymine déterminée par MARSHAK et VOGEL (1951).

c) Quelle que soit la méthode employée, la détermination de la quantité d'ADN par oeuf se heurte à la difficulté qui résulte de la présence de cellules contaminantes. Le nombre de celles-ci est difficile à déterminer avec précision. D'autre part, l'interprétation des résultats est subordonnée à une hypothèse concernant le rapport entre la quantité d'ADN contenue dans une cellule contaminante et celle que contient un ovocyte. L'incertitude qui en découle dépasse largement les erreurs qui peuvent résulter des méthodes de mesure employées. Il ne fait aucun doute que de nouvelles recherches mériteraient d'être faites en vue d'aboutir à l'élimination de ces cellules contaminantes.

2° - Comparaison avec les résultats des auteurs

Il faut distinguer, dans les résultats de la littérature, ceux qui ont été obtenus par MARSHAK et MARSHAK de ceux qui sont fournis par tous les autres auteurs cités dans l'introduction. En effet, à part MARSHAK et MARSHAK, aucun auteur n'a tenu compte de l'existence de cellules contaminantes, ce qui peut expliquer, en partie, les chiffres élevés obtenus. Cependant, cet unique défaut ne suffit pas à expliquer toutes les différences.

- Dans tous les cas, le dénombrement des oeufs a été effectué par des méthodes peu précises. Quant à l'extraction, elle est pratiquée soit selon SCHMIDT et THANNHAUSER, soit selon SCHNEIDER, c'est-à-dire par des méthodes qui aboutissent à des purifications très incomplètes. SCHMIDT, HECHT et THANNHAUSER (1948) effectuent sur ces extraits un dosage de phosphore, faussé par la présence de phosphoprotéine et d'ARN, ce qui doit expliquer les chiffres très élevés obtenus.

VENDRELY (1949, 1952) fait une extraction selon SCHNEIDER, particulièrement inappropriée, et un dosage selon DISCHE plus spécifique que le dosage du phosphore; il obtient ainsi un chiffre très élevé, mais inférieur à celui des auteurs précédents.

ELSON et CHARGAF (1952), HOFF-JØRGENSEN (1954) emploient des méthodes de séparation imparfaites mais une méthode de dosage microbiologique relativement spécifique. Les résultats élevés qu'ils obtiennent relèvent, sans doute, pour la plus grande part, des imperfections relatives à la méthode d'extraction.

- Les résultats bruts de MARSHAK et MARSHAK (1953) sont en revanche très proches des nôtres. Si l'on néglige la présence de cellules contaminantes, ces auteurs trouvent en effet : $8,1 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ d'ADN par oeuf d'Arbacia, tandis que nous obtenons $(5,6 \pm 0,5) \times 10^{-6} \mu\text{g}$ par le sucre ou $(4,9 \pm 0,3) \times 10^{-6} \mu\text{g}$ par la thymine.

Les estimations de MARSHAK et MARSHAK (1953) peuvent faire l'objet de quelques critiques. D'une part, les extractions comportent des purifications qui paraissent insuffisantes; d'autre part, la quantité de thymine recueillie sur les chromatogrammes ($7,2 \mu\text{g}$) est bien faible pour fonder des tests de pureté. De plus, la quantité de thymine marquée employée dans la dilution isotopique est très élevée, ce

qui entraîne une incertitude que les auteurs paraissent avoir négligée et qui, dans les conditions où ils opèrent, se monte à $\pm 24\%$. Le dénombrement des cellules contaminantes n'a été fait que d'une manière approximative (1 à 2 cellules par oeuf) et les oeufs ont conservé leurs globules polaires, la gangue n'ayant pas été enlevée. Ces diverses causes d'erreur permettent d'expliquer les chiffres légèrement plus faibles que nous trouvons. Elles conduisent également à considérer que les chiffres de MARSHAK et MARSHAK (1953) sont affectés d'incertitudes plus élevées que celles de nos propres déterminations, ce qui rend les raisonnements de ces auteurs bien aléatoires.

Les travaux publiés par MARSHAK et MARSHAK en 1955 et qui portent essentiellement sur Tripneustes ventricosus semblent beaucoup plus satisfaisants, les causes d'erreur ayant été cernées de façon plus rigoureuse. Il subsiste cependant une incertitude due à la dilution isotopique de l'ordre de 8% alors que les auteurs n'admettent qu'un écart-type de 0,46%. Il y a lieu de noter également que, dans les calculs de leurs marges de sécurité, ils adoptent l'écart-type alors que la marge de sécurité pour $P = 0,95$ est le plus souvent proche de 2⁶. Il en résulte que, là encore, les estimations de MARSHAK et MARSHAK sont certainement moins précises que ne le jugent leurs auteurs. La quantité de thymine qu'ils trouvent dans un oeuf est d'environ 3 fois la valeur obtenue pour un spermatozoïde. On peut juger qu'il s'agit là d'une approximation intéressante, sujette toutefois à une incertitude qui est loin d'être négligeable.

3° - L'ADN cytoplasmique dans l'oeuf d'Arbacia

Compte-tenu de l'ensemble des incertitudes relevées, nous avons abouti à une quantité d'ADN par ovocyte vierge qui doit être comprise entre 1,5 et $5,2 \times 10^{-6} \mu\text{g}$. Rappelons que les quantités d'ADN trouvées par spermatozoïde sont de l'ordre de $10^{-6} \mu\text{g}$; en outre, HINEGARDNER trouve dans le noyau ovocytaire isolé d'Echinometra mathaei une quantité de $0,99 \times 10^{-6} \mu\text{g}$. Les chiffres que nous avons obtenus montrent que dans l'ovocyte total dégangé, la quantité d'ADN est au moins équivalente à ces chiffres caractéristiques du stock haploïde. Cet ADN ne peut être attribué aux globules polaires qui ont disparu au cours du dégangage.

Peut-on conclure, de ces chiffres, à l'existence d' un ADN cytoplasmique ? La chose est incertaine. Il est évident que les quantités d' ADN trouvées sont à la limite de celle qui correspondrait à l'existence d'un stock haploïde dans l'ovocyte. Si l'on était conduit à admettre que les chiffres les plus valables se trouveraient dans la partie la plus élevée de l'intervalle déterminé, l'hypothèse d'un ADN cytoplasmique pourrait être retenue. Mais il est clair que cette conclusion ne pourra être avancée sans que des travaux complémentaires soient venu préciser les résultats que nous apportons.

De toute manière, s'il existait un ADN cytoplasmique dans l'oeuf d'Arbacia lixula, sa quantité serait très inférieure aux chiffres qui ont été parfois avancés. Elle serait, au plus, équivalente à celle de deux cellules diploïdes normales, ce qui expliquerait l'existence d'une synthèse nette d'ADN, sensible, dans les observations autoradiographiques, dès le début de la segmentation.

Les résultats auxquels on parvient ainsi s'écartent de ceux de la plupart des auteurs qui ont, certainement par suite de purifications insuffisantes, estimé l' ADN avec une forte erreur par excès. Cette erreur se retrouve dans les dosages effectués sur les oeufs en cours de segmentation où la présence des impuretés masque la synthèse d'ADN. Nos interprétations s'écartent aussi de celles de MARSHAK et MARSHAK, bien que les chiffres bruts trouvés par ces auteurs soient fort proches des nôtres. Mais on notera que ces auteurs semblent attribuer aux valeurs qu'ils trouvent une précision dont elles restent sans doute assez éloignées. D'autre part, ils estiment que l'ADN dosé dans l'oeuf d'Arbacia correspond, pour les 2/3 environ, aux cellules contaminantes et aux globules polaires. Quant au tiers restant (environ 3×10^{-6} μ g par oeuf) ils se refusent à en admettre la présence dans le noyau Feulgen-négatif. Ainsi, la localisation cytoplasmique de l' ADN ovocytaire d'Arbacia admise par MARSHAK et MARSHAK (1953) ne repose en aucune façon sur les dosages qu'ils ont effectués, mais uniquement sur l'incolorabilité du noyau par la réaction de Feulgen. Sans doute, cet argument n'est-il pas dépourvu de valeur. Encore pourrait-on supposer que cette difficulté à colorer le noyau doit être attribuée à une évolution dans la structure physique de l'ADN et non à sa disparition. On expliquerait ainsi le fait que le noyau peut être co-

loré dans diverses conditions et que HINEGARDNER ait pu y déceler une quantité haploïde d'ADN.

En 1955, MARSHAK et MARSHAK tiraient la même conclusion, relative à l'absence d'ADN nucléaire, de résultats numériques sensiblement différents, obtenus chez Tripneustes ventricosus. Cette fois, les valeurs trouvées pouvaient correspondre exclusivement au contenu des globules polaires : l'ADN cytoplasmique lui-même disparaît.

Il semble en vérité que l'on puisse admettre les conclusions suivantes :

- 1° - Les dosages d'ADN effectués sur les oeufs d'Echinodermes ont atteint une sensibilité qui conduit à des chiffres très proches obtenus par des auteurs différents, sur des espèces distinctes et par des méthodes diverses. Ces chiffres correspondent à un petit multiple de la quantité présente dans le spermatozoïde.
- 2° - Les chiffres obtenus sont encore affectés de quelques incertitudes qui reposent en partie sur le fait que la substance recherchée se trouve en concentration excessivement faible. Sur ce plan, il semble que des progrès puissent être accomplis.
- 3° - Les chiffres obtenus conservent également des incertitudes issues de la présence de cellules ou d'organites contaminants. Il semble possible d'obtenir la disparition de ces contaminations par des méthodes appropriées (digestion enzymatique, etc). Reste à savoir si de telles méthodes n'entraîneraient pas de nouvelles erreurs dans le dosage du contenu en ADN de l'ovocyte.
- 4° - Tels qu'ils sont, les chiffres ne sont pas suffisants pour appuyer des conclusions telles que celles de MARSHAK et MARSHAK, pas plus d'ailleurs que celles des auteurs qui veulent voir dans le cytoplasme de l'oeuf d'Echinoderme une réserve d'ADN : tout au plus pourra-t-on dire que cette réserve doit être faible si toutefois elle existe.

R E S U M E

1° Lorsque l'ADN obtenu à partir d'ovocytes de *Xenopus laevis* a subi des modifications postérieures, l'analyse par densité montre que le rapport molaire $\frac{A}{T}$ a une valeur de 0,96 $\pm$ 0,02, caractéristique identique à celle trouvée dans les gamètes mâles de la même espèce.

2° Le contenu des ovocytes en ADN a été déterminé par deux méthodes et dosage de la thymine. Ces deux séries de dosage ont fourni des résultats comparables :

$$\begin{aligned} \text{par la méthode } 1 & : (5,6 \pm 0,5) 10^{-6} \text{ g. par ovocyte} \\ \text{par la méthode } 2 & : (4,9 \pm 0,3) 10^{-6} \text{ g. par ovocyte} \end{aligned}$$

3° Cependant, la présence des cellules contaminantes ainsi que les écarts d'erreur provenant des méthodes expérimentales ne permettent pas de fournir une valeur exacte mais un ordre de grandeur de la quantité d'ADN par ovocyte. On peut conclure que le contenu des ovocytes en ADN est compris entre $4,5$ et $6,5 \times 10^{-6}$ g.

4° Ces chiffres ne permettent pas d'adopter une position définitive relative ou négative, quant à l'existence d'une membrane nucléaire cytoplasmique. Si celle-ci existe, elle ne semble pas exercer de l'influence de la valeur caractéristique d'une certaine manière.

B I B L I O G R A P H I E

- AGRELL (I.) et PERSSON (H.) - 1956 - Changes of the amount of nucleic acids and free nucleotides during early embryonic development of sea-urchin. Nature, 178, p. 1398.
- BUCHER (N.) et MAZIA (D.) - 1960 - DNA synthesis in relation to duplication of centers in dividing eggs of sea-urchin Strongylocentrotus purpuratus. J. Bioph. Biochem. Cyt. 7, p. 651.
- BURTON (K.) - 1955 - A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. Biochem. J. 62, p. 315.
- CHARGAFF (E.) et al. - 1952 - Composition of the deoxypentose nucleic acids of four genera of sea-urchin. J. Biol. Chem. 195, p. 133.
- DURAND (M.) - 1955 - L'acide desoxyribonucléique des gamètes de Gryllus domesticus. Compt. Rend. Acad. Sci. 241, p. 1340.
- ELSON (D.) et CHARGAFF (E.) - 1952 - On the deoxyribonucleic acid content of sea-urchin eggs. J. Biol. Chem. 195, p. 143.
- FICQ (A.), AIELLO (F.) et SCARANO (E.) - 1963 - Metabolisme des acides nucléiques dans l'oeuf d'oursin en développement. Exp. Cell Res. 25, p. 341.
- FICQ (A.) et BRACHET (J.) - 1963 - Métabolisme des acides nucléiques et des protéines chez les embryons normaux et les hybrides létaux entre Echinodermes. Sous presse.
- HARVEY (E.) - 1956 - The American Arbacia - p. 125.
- HINEGARDNER (R.T.) - 1961 - The DNA content of isolated sea-urchin egg nuclei. Exp. Cell Res. 25, p. 341.
- HOFF-JØRGENSEN (E.) - 1954 - Deoxyribonucleic acid in some gametes and embryo. 7th symposium of the Colston Research Society. Recent developments of cellular physiology (J. A. Kitching - London) p. 79.
- MARSHAK (A.) et VOGEL (H.J.) - 1951 - Microdeterminations of purines and pyrimidines in biological material. J. Biol. Chem. 189, p. 597.

- MARSHAK (A.) et MARSHAK (C.) - 1953 - DNA in Arbacia eggs. Exp. Cell Res. 5, p. 288.
- MARSHAK (A.) et MARSHAK (C.) - 1955 - Quantitative determination of DNA in echinoderm germ cells. Exp. Cell Res. 8, p. 126.
- MARSHAK (A.) et MARSHAK (C.) - 1956 - On the question of the DNA content of sea-urchin eggs. Exp. Cell Res. 10, p. 246.
- NIGON (V.) et NONNENMACHER (J.) - 1960 - Etude autoradiographique de l'incorporation de thymidine tritiée dans les oeufs de Arbacia lixula. C.R. Acad. Sci. Paris 271, p. 107.
- SCHMIDT (G.) et THANNHAUSER (S.J.) - 1945 - A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem. 161, p. 133.
- SCHMIDT (G.), HECHT (L.) et THANNHAUSER (S.J.) - 1948 - The behaviour of the nucleic acids during the early development of the sea-urchin egg (Arbacia). J. Gen. Physiol. 31, p. 203.
- SCHNEIDER (W.C.) - 1945 - Phosphorus compounds in animal tissues .I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid in Arbacia. J. Biol. Chem. 161, p. 133.
- SIMNEL (E.B.) et KARNOPSKY (D.A.) - 1961 - Observations on the uptake of tritiated thymidine in the pronuclei of fertilized Arbacia embryos. J. Biol. Chem. 234, p. 59.
- VENDRELY (C.) et VENDRELY (R.) - 1949 - Sur la teneur en acide desoxyribonucléique des gamètes d'oursin Arbacia et Paracentrotus. C.R. Sec. Biol. 143, p. 1386.
- VENDRELY (C.) - 1952 - L'acide desoxyribonucléique des cellules animales. Bull. Biol. France et Belgique. 86, p. 1.

Vu :

Les Membres du Jury,

MM. NIGON

LEGAY

LAVIOLETTE

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Jean BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 5 JUILLET 1963

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

